



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사 학위논문

성체 간엽 줄기세포가
표피의 재생에 미치는 영향

2018년 2월

서울대학교 대학원

의학과 피부과학 전공

최 지 응

성체 간엽 줄기세포가 표피의 재생에 미치는 영향

지도교수 박 경 찬

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함

2017년 월 일

서울대학교 대학원

의학과 피부과학 전공

최지웅

최지웅의 박사 학위논문을 인준함

2017년 12월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

Effects of adult mesenchymal stem cells in the epidermal regeneration

by

Jee-Woong Choi

(Directed by Kyoung-Chan Park, M.D., Ph.D.)

A thesis submitted to the Department of Medicine in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Medical Science (Dermatology) at Seoul National University College of Medicine

October, 2017

Approved by thesis committee

December, 2017

Professor _____Chairman

Professor _____Vice Chairman

Professor _____

Professor _____

Professor _____

요약 (국문초록)

최근 조직 재생 공학에서 줄기세포를 많이 이용하고 있다. 그 중 성체 간엽 줄기세포는 몸의 다양한 조직에서 분리가 가능하며 윤리적인 제약 조건이 적어 창상 치유, 피부 노화의 분야에서 이들 세포에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 본 연구에서는 창상 후 발생하는 표피 재생 과정에서 이들 줄기세포가 갖는 진피-표피 상호작용을 3차원 인공피부를 배양하여 모델링하고, 줄기세포가 관여하는 표피 재생 과정에서 중요한 역할을 하는 단백질에 대해 알아보고자 연구를 시행하였다.

성체 간엽 줄기세포의 표피 재생 효과를 알아보기 위해 세 가지 다른 종류의 세포 (섬유모세포, 지방 줄기세포, 골수 간엽 줄기세포)로 3차원 인공피부 모델을 구현하였다. 각각의 진피 구성 세포에서 배양된 인공피부에서 나타나는 기저 세포의 증식 정도, 기저막의 형태, 그리고 표피와 기저막의 두께 등을 비교하였고, 표피 증식 관련 단백질, 표피 분화 관련 단백질, 기저막 발현 단백질, 그리고 피부 창상 관련 단백질 등 다양한 단백질에 대해 면역형광염색을 시행하였다. 또한 세 종류의 진피 구성 세포의 유전자 발현을 high-throughput mRNA sequencing으로 분석하였고, 발현양의 차이를 보이는 유전자와 관련된 단백질을 직접 비교하기 위해 추가적인 면역형광염색을 시행하고 육안 평가 및 이미지 분석을 하였다.

성체 줄기세포를 이용하여 배양한 인공피부는 섬유모세포 기반의 인공피부와 비교할 때, 표피의 구조 및 기저층 세포의 형태

면에서 정상 피부와 더 유사한 양상을 보였다. 면역형광염색 결과에서도 표피증식 관련 단백질 PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 또는 p63이 줄기세포 기반의 인공피부에서 더 강하게 발현하였고, 기저막 구성 단백질인 integrin 역시 더 강하게 발현하였다. 이는 성체 줄기세포에서 증가되어 있는 EGF-like domain 클러스터에서 발현되는 단백질과 성체 줄기세포가 가지는 항산화 효과 때문인 것으로 생각된다.

표피에서 주로 발현하는 창상 관련 단백질 galectin-7은 성체 줄기세포를 기반으로 만든 인공피부의 표피에서 더 강하게 발현하였고 이는 기존에 보고한 연구 결과와 유사하였다. Activin A는 high-throughput mRNA sequencing 분석 결과, 섬유모세포에 비해 성체 줄기세포에서 유의하게 많이 발현했고, 면역형광염색에서도 표피와 진피에서 유의하게 많이 발현됨을 확인한 단백질이다. 본 단백질은 근거리 분비 효과 (paracrine effect)로 각질형성세포에 영향을 주어 더 많은 activin A를 발현하도록 하고 완성도가 더 높은 인공피부를 만드는데 기여하며, 각질형성세포가 만드는 activin A는 다시 진피에 영향을 주어, 진피-표피의 상호작용의 선순환을 연결하는 중요한 매개 단백질로 추정된다.

주요어 : 지방 줄기세포, 골수 간엽 줄기세포, 표피 재생, 인공피부, 창상 회복

학번 : 2015-30575

목 차

I. 서론	-----1
II. 연구 재료 및 방법	-----6
III. 연구 결과	----- 12
IV. 고찰	----- 31
V. 결론	----- 38
참고문헌	----- 39
영문초록	----- 45
감사의 글	----- 48

표 목차

[Table 1]	-----17
[Table 2]	-----18
[Table 3]	-----19
[Table 4]	-----20

그림 목차

[Figure 1]	----- 21
[Figure 2]	----- 22
[Figure 3]	----- 23
[Figure 4]	----- 24
[Figure 5]	----- 25
[Figure 6]	----- 26
[Figure 7]	----- 27
[Figure 8]	----- 28
[Figure 9]	----- 29
[Figure 10]	----- 30

I. 서론

1.1 창상 회복에서 재상피화

조직의 재생과 장기의 형성에서 가장 중요한 과정은 간엽과 상피의 상호작용 (mesenchymal-epithelial interaction)이다. 간엽 기원의 세포는 조직 내의 항상성 (homeostasis)을 유지하기 위해 다양한 단백질을 분비하며, 조직 손상이 발생한 경우에는 복구 과정에서 상피 세포와의 활발한 상호작용을 일으킨다 (1,2). 피부에서도 이러한 과정이 예외는 아니다. 피부는 머리에서 발 끝까지를 감싸며, 외부로부터의 자극, 감염 등에 대해 인체를 보호하는 가장 큰 장기로서 피부가 손상되면 이를 복구하기 위한 빠른 창상 회복 반응이 일어난다 (3). 진피 내에 존재하는 간엽 기원 세포는 창상 발생 후 일어나는 염증 (inflammation), 혈관증식 (angiogenesis), 그리고 조직 재형성 (tissue remodeling)의 모든 과정에 관여하며, 그 중 섬유모세포는 성장인자와 사이토카인을 분비하고 세포외 기질을 생산하여 표피의 재생 (epidermal regeneration)에 결정적인 역할을 담당한다 (4-7). 하지만 진피에는 섬유모세포 뿐만 아니라, 진피 줄기세포 (dermal stem cell)를 비롯한 많은 종류의 간엽 기원 세포가 존재하며, 최근 Zuk 등에 의해 다중 분화능을 가지는 성체 줄기세포가 피하 지방에도 존재함이 확인된 바 있다 (8,9). 따라서 진피 혹은 피하에 존재하는 다양한 간엽 기원 세포들이 진피-표피 상호작용 (dermo-epidermal interaction)을 통해 창상 후 재상피화 (re-epithelialization)과정에서 중요한 역할을 담당하고 있다고 생각된다.

1.2 창상 회복에서의 성체 간엽 줄기세포

최근 조직 재생 공학에서 줄기세포를 많이 이용하고 있다. 그 중 성체 간엽 줄기세포 (adult mesenchymal stem cell, AMSC)는 1963 년 Baker 등에 의해 골수에서 처음 발견되었고, 미분화 상태로 자가 증식을 하며 섬유모세포를 비롯한 다른 조직의 세포로 분화할 수 있다 (10-12). Caplan 등은 이들 세포가 연골세포, 골세포 그리고 근육세포로 분화가 가능하다는 증거를 처음 제시하였고, 배양 조건을 다르게 하면 *in vitro* 에서 신경세포 및 각질형성세포로 분화 (trans-differentiation)할 수 있다는 것도 확인하였다 (13,14). 성체 간엽 줄기세포는 골수 외에도 지방을 비롯한 몸의 다양한 조직에서 분리가 가능하며, 배아 줄기세포와 달리 연구에 필요한 윤리적인 제약 조건이 적어 창상 치유, 혈관 생성 촉진, 피부 노화 등 다양한 분야에서 이들 세포에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 하지만, 피부 손상 후 창상 치유 과정에서 성체 간엽 줄기세포가 어떠한 상호작용을 통해 표피의 재생에 관여하는지에 대한 연구는 거의 없고, 기존의 연구들도 동물실험에 근거한 결과가 대부분이다. 따라서 창상 치유 중 발생하는 진피와 표피의 상호작용에서 줄기세포가 가지는 역할을 확인하고 이를 임상적으로 활용하기 위해서는, 세포와 세포 사이의 상호작용을 규명하기 위한 연구가 반드시 필요하다.

본 연구에서, 표피 재생과의 상호작용을 보고자 하는 성체 간엽 줄기세포는 두 가지이다. 하나는 골수 간엽 줄기세포 (bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)로, 성체 간엽 줄기세포 중에 가장 먼저 알려졌으며 현재까지 가장 많은 연구가 이루어 졌다. 골수 간엽 줄기세포는 창상이 있는 부위로 직접 이동하여 다양한 세포로 분화하고,

그 곳의 다른 세포들이 빠르게 재생될 수 있는 환경을 제공하기도 한다 (15,16). 예를 들면, 피부에 창상이 발생했을 때, 해당 부위로 이동 후 표피 재생을 위한 성장인자 (growth factor)를 분비하고 각질형성세포와의 직간접적인 상호 작용으로 피부 재생을 돕는 것이 그러하다 (17,18). 본 연구에서 보고자 하는 다른 하나의 성체 간엽 줄기세포는 지방 줄기세포 (adipose-derived stem cell, ADSC)로, 지방흡입을 통해 비교적 손쉽게 다량의 세포를 얻을 수 있으며, 골수 간엽 줄기세포보다 줄기세포로의 특성이나 분화능이 뒤떨어지지 않으면서, 배양이 용이하고 증식 속도가 빠르다. 특히, 세포 노화 현상이 늦어 어느 연령층에서도 줄기세포의 특성을 비슷하게 유지한다는 점은 골수 간엽 줄기세포와 다른 점이다 (19). 또한, 성숙한 지방세포를 포함하여 인공피부를 배양할 경우 그렇지 않은 경우에 비해 배양된 인공피부 표피의 증식과 분화가 더욱 촉진되었다는 연구 결과가 있는데, 성숙한 지방세포에는 지방 줄기세포가 포함되어 있다는 것을 주목할 필요가 있다 (20).

1.3 인공피부 모델을 이용한 진피-표피 상호작용 연구

본 연구에서는 창상 회복의 모델을 구현하고 피부 재생에서 성체 간엽 줄기세포의 효과 및 진피-표피 상호작용을 확인하기 위해, 이들 줄기세포를 이용한 3 차원 인공피부 모델을 제작하고 이를 섬유모세포로 만든 인공피부와 비교해 보고자 한다. 3 차원 인공피부 (living skin equivalent, LSE)란 실제 사람의 피부와 비슷한 조직을 인위적으로 만든 것으로, 신약 또는 화장품의 독성 연구를 위한 기초 실험을 하기

위해 사용한다. 인공피부는 실험동물을 통한 생체실험보다 많은 장점을 가질 뿐 아니라, 사람의 세포 (섬유모세포, 각질형성세포)를 이용한 연구라는 측면에서 효용 가치가 매우 크다 (21-23). 인공피부를 만드는 가장 대표적인 방법은 섬유모세포가 포함된 다양한 기질로 구성된 진피 대체물 위에 각질형성세포를 배양하는 것이며, 현재 가장 널리 사용되는 방법이다. LSE 는 3-4 주 정도의 제작시간이 소요되고 T 세포를 활성화 시키는데 필요한 항원전달 세포가 없으며 배양에 사용하는 섬유모세포나 각질형성세포 또한 면역관련 세포유착 분자를 발현하지 않아 동종이식 후에도 특별한 거부 반응이 없다 (24). 성체 간엽 줄기세포가 표피 재생에 미치는 영향을 보기 위해, 줄기세포를 직접 사람의 창상에 주입한 후 나타나는 여러 양상을 관찰할 수 있다면 가장 정확한 결과를 얻을 수 있겠지만, 동종이식 거부반응의 가능성이 있어 이는 현실적으로 불가능하다. 따라서 인공피부 모델을 이용한다면, 보다 현실적이면서 실제 적용이 가능한 연구 결과를 얻을 수 있을 것이라 사료된다.

성체 간엽 줄기세포가 표피 재생에 미치는 효과를 보기 위해 인공피부의 3 차원 모델을 이용한 연구는 많지 않고, 세 가지의 세포 (섬유모세포, 지방 줄기세포, 골수 간엽 줄기세포)를 모두 같은 조건에서 동시에 비교한 연구는 전무하다. 또한 이러한 세포가 궁극적으로 광범위한 화상이나 난치성 궤양 등의 창상 치료에 활용되는 것임을 착안한다면, 세포가 표피 분화 및 기저층의 형성에 미치는 영향 뿐만 아니라, 창상 회복 관련 단백질의 직접적인 발현 양상 또한 반드시 분석해 보아야 할 것이다. 따라서 본 연구에서는 배양한 인공피부의 H&E (hematoxyline and eosin) 염색과 함께 표피 증식 관련 단백질, 표피 분화 관련 단백질, 그리고 기저막 관련 단백질의 발현을 살펴보고,

더불어, 진피 대용물에 첨가하는 세 종류의 세포에 대해 Next Generation Sequencing (NGS)을 이용한 total mRNA sequencing 을 시행하여, 인공피부의 형태학적 차이가 어떤 유전자에서 비롯되었는지 알아보았다. 마지막으로 이들 유전자가 어떻게 발현하는지 면역형광염색을 통해 확인해 보고, 표피의 재생 및 진피-표피 상호작용에 이들 단백질이 미치는 영향에 대해 고찰하였다.

II. 연구 재료 및 방법

2.1 인공피부의 배양

인공피부는 기존에 보고한 방법으로 배양하였으며 (25-28), 진피 구성 세포를 바꾸어 가며 모두 세 종류의 인공피부를 제작하였다. 인공피부 모델을 만들기 위한 섬유모세포와 각질형성세포는 소아 포경 수술 시에 얻어지는 귀두포피에서 분리하였고, 사람의 골수 간엽 줄기세포 (PT-2501, Lonza, Walkersville, MD)와 지방 줄기세포 (PT-5006, Lonza, Walkersville, MD)는 구매하여 사용하였다. 세포들은 10%의 fetal bovine serum (FBS), 50 μ g/mL의 스트렙토마이신 및 50U/mL의 페니실린을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에서 37°C, 5% CO₂의 조건 하에서 배양하였으며, 섬유모세포, 골수 간엽 줄기세포 및 지방 줄기세포는 두 번의 계대배양 후 인공피부 제작에 사용하였다. 진피 대체물에 첨가하는 콜라겐을 만들기 위하여, 쥐(rat)의 꼬리에서 인대를 뽑아 70% 에탄올에 수 분간 담가놓은 뒤, phosphate buffered saline (PBS)에 옮겨 세척하였다. 이후 인대의 수분을 제거한 후 0.1% acetic acid에 넣어 4°C에서 일주일 동안 교반하여 최종 농도가 10 μ g/mL가 되도록 제1형 콜라겐을 추출하였다.

진피 대체물을 제작하기 위해 쥐의 꼬리에서 추출한 제1형 콜라겐, 10배로 농축된 배지 (DMEM : Ham' s nutrient mixture F12 = 3 : 1), 중화 완충액 (0.05 N NaOH, 0.26 mM NaHCO₃, 200 mM HEPES)을

준비하고, 이들을 각각 8:1:1의 비율로 혼합하여 진피 기질을 만들었다. 진피 대체물은 3 mL의 진피 기질에 섬유모세포 3×10^5 cells를 함께 혼합하여 24 mm transwell inserts (Corning, Inc., USA)에 넣고 37°C에서 젤화 (gelation)하여 만든다. 인공피부를 만들기 위해 젤 상태인 진피 대체물 위에 각질형성세포 1×10^6 cells를 뿌려주고 충분히 잠기도록 배양액을 넣어 1일간 배양하고 (submerged state), LSE의 각질형성을 위해 transwell insert 밖에만 배양액을 넣어 12일 동안 공기에 노출하여 배양하였다 (air-exposed state). 인공피부를 배양액에 잠겨 배양할 때는 1 ng/mL epidermal growth factor (EGF, Invitrogen, corp. USA)를 배양액에 처리하였고, 공기 노출 배양 시에는 10 ng/mL EGF를 처리하였다.

지방 줄기세포와 골수 간엽 줄기세포를 진피 구성 세포로 하는 인공피부를 만들기 위해, 진피 대체물을 만들기 위한 과정 중 섬유모세포를 대신하여 3×10^5 cells을 진피 기질과 함께 섞어 젤화시키고, 해당 줄기세포를 진피 대체물에 첨가한다. 다른 배양 조건은 동일하게 하고, 각각 다른 진피 구성 세포를 가지는 세 종류의 인공피부를 제작하였으며, 2회의 독립적인 실험을 시행하였다.

2.2 인공피부의 조직학적 형태관찰

배양이 끝난 인공피부 조직을 transwell insert로부터 분리하여, 10% 포르말린에 24시간 고정한 후 파라핀에 포매하여 블록을 만든다. 만들어진 파라핀 블록으로 미세 절편을 얻고, 세포의 형태학적인 차이를 비교하기 위해 H&E 염색 후 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)으로

관찰하고 디지털 카메라 시스템으로 촬영하였다 (X400).

2.3 유전자 발현 분석

2.3.1 진피 구성 세포의 대용량 mRNA 시퀀싱

앞서 제작한 세 가지 인공피부의 배양조건 중 진피 구성 세포의 종류가 다른 것 외에는 모두 동일하므로, 각각의 인공피부가 가지는 형태학적 차이는 진피 구성 세포에서 비롯된 것이라 할 수 있다. 따라서 진피 구성 세포로 사용한 섬유모세포, 지방 줄기세포, 골수 간엽 줄기세포의 유전자 발현 양상을 비교하기 위해 high-throughput mRNA sequencing을 시행하였다. TRIzol® RNA Isolation Reagents (Life technologies, Carlsbad, CA)를 사용하여 섬유모세포, 지방 줄기세포 및 골수 간엽 줄기세포로부터 전체 RNA를 분리하였다. RNA의 integrity는 bioanalyzer인 Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent, Santa Clara, CA)로 확인하였다. 분리된 전체 RNA는 TruSeq stranded mRNA sample preparation kit (Illumina, San Diego, CA)를 사용하여 mRNA sequencing 라이브러리를 제조하기 위해 제조사의 지침에 따라 처리하였다. 각각의 mRNA 라이브러리에 대해 Agilent DNA Kit (Agilent, Santa Clara, CA)를 사용하는 bioanalyzer로 약 200 bp의 삽입 크기를 확인하였고, CFX96 실시간 시스템 (BioRad, Hercules, CA)을 사용하여 real-time PCR로 라이브러리를 정량화하였다. 모든 mRNA 샘플은 Illumina NextSeq 500 Sequencer with 75-bp paired end high output kit를 이용하여 sequencing하였고, 원본 이미지 데이터는 base-calling에 의해 sequence 데이터로 변환

후 nucleotide sequence를 저장하기 위한 텍스트 기반 파일인 FASTQ 형식으로 저장하였다.

2.3.2 Enrichment and pathway analysis

mRNA sequencing 결과로부터 섬유모세포에 비해 각 줄기세포에서 공통적으로 유의하게 달리 발현한 유전자 (fold change >4 또는 <0.25, $p < 0.05$)들을 대상으로, 기존의 유전학적 지식과 통합하여 관련된 세포신호 경로에 대한 가능성 높은 설명을 제시하고 그 의미를 이해해 보고자 하였다. 본 연구에서는 웹 기반의 유전자 분석 시스템인 Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)를 이용하며, functional annotation clustering 및 enrichment analysis를 시행했고 주어진 유전자들의 생물학적인 기능을 이해하고자 하였다 (29). 그리고 추출된 유의 유전자들이 어떤 생물학적 세포 신호 경로와 연관되는지 알아보기 위해 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 데이터베이스를 이용하였다 (30–32). 추가적으로 이들 유전자들의 발현양에 대한 연관성을 보기 위해 microarray 전용 분석 프로그램인 MultiExperiment Viewer (MeV)를 이용해 average linkage clustering을 시행하였다 (33).

2.4 면역형광염색 및 염색강도 평가

세포의 증식 및 분화 그리고 기저막 형성 등을 보기 위해 면역형광 염색을 시행하였고, 섬유모세포 대비 진피 구성 세포에서 차별 발현한

유전자의 분석을 바탕으로 창상 회복과 관련된 단백질에 대한 면역형광 염색도 추가로 시행하였다. 두 가지 단백질의 발현 정도를 동시에 보기 위해 이중 면역형광 염색 (double immunofluorescence) 기법을 이용하였고, 2차 항체는 Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse, Alexa Fluor 488 chicken anti-rabbit, Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse, 그리고 Alexa Fluor 555 chicken anti-rabbit의 네 종류를 1차 항체의 조합에 맞추어 사용하였다 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.). 단백질 발현의 양상을 보기 위해서 공초점 현미경 (LSM710, Carl Zeiss Microimaging, Thornwood, NY)으로 관찰하고, 형광염색의 강도를 평가하기 위해 촬영 조건은 모두 동일하게 유지하였다. 세 종류의 진피 구성 세포로 두 번 독립적으로 배양한 인공피부에 대해 염색을 시행하였고, 인공피부의 중앙부위 세 군데를 선택한 후 200배 이미지를 촬영하여 한 가지 항체 당 18개의 이미지를 얻었다.

각 단백질 항체의 발현강도를 보기 위해, 먼저 면역형광염색 이미지에 대한 육안평가를 시행하였다. 표피 및 진피의 전체적인 염색 정도를 보고, 전혀 염색이 되지 않은 경우 0점, 윤곽이 명확하지 않고 산발적으로 약하게 염색되는 경우 1점, 윤곽이 명확하고 고르게 염색되는 경우 2점, 전체적으로 강하게 염색되는 경우를 3점으로 하여 4-point scale을 이용해 평가하였다 (Figure 1). 동일한 진피 구성 세포로 배양한 인공피부에 대해 한 가지 항체 염색 후에 얻은 영상은 모두 6개이므로, 이 이미지의 발현강도를 위의 기준에 따라 평가한 후 점수의 평균을 구하여 각각 비교하였다.

육안평가에서 유의미한 단백질항체에 대해 정량적인 이미지 분석을 하기

위해 Image Pro-Plus 6.0 (Media Cybernetic, Rockville, MD, U.S.A.)을 이용하였다. 분석 방법에 대해 약술하면, 분석이 되는 영역 (표피 또는 진피)을 찾아 구역을 나누어 준 후, 해당 구역에서의 녹색 혹은 적색의 신호 강도를 측정한다. 그리고 측정된 신호강도에 대해 해당구역의 면적을 나누어 단위 면적당 신호 강도의 밀도를 계산하고 이들의 평균을 구하여 각각 비교하였다. 신호 강도의 밀도는 이미지 분석 프로그램에서 계산된 arbitrary unit을 이용하였고 (최소값: 0, 최대값: 255), 색의 강도에 따른 arbitrary unit의 관계는 Figure 2에 첨부하였다. 위와 유사한 이미지 분석방법을 기존의 인공피부 연구에 적용하여 실효성을 확인한 바 있다 (28).

2.5 통계적 분석

통계분석을 위해 SPSS 통계 패키지 (SPSS® 20.0KO for Windows; IBM Co., Armonk, NY, USA)를 사용하였고, 분석의 변수는 표본 크기가 작기 때문에 정규성에 대한 가정을 만족시키지 않아 비모수적 방법을 이용하였다. 통계분석을 하고자 하는 인공피부가 세 군 (섬유모세포 기반의 인공피부, 지방 줄기세포 기반의 인공피부, 그리고 골수 간엽 줄기세포 기반의 인공피부)이므로, Kruskal-Wallis test를 사용하여 각각의 인공피부에서 발현하는 단백 항체의 강도를 비교 분석하였다. $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의하게 평가하였고, 두 군씩 쌍을 지어 Bonferroni's method ($p < \frac{0.05}{3} = 0.017$)로 제1종 오류를 보정하여 Mann-Whitney test로 사후검정을 시행하였다.

III. 연구 결과

3.1 배양한 인공피부의 형태학적 분석

섬유모세포, 지방 줄기세포, 골수 간엽 줄기세포를 진피 세포로 사용했을 때, 두 번의 독립된 실험에서 모두 3차원 인공피부가 성공적으로 배양되었다. 인공피부의 H&E 염색을 보면, 줄기세포를 진피 세포로 이용한 인공피부에서 기저층을 형성하는 각질형성세포의 수가 더 많고 정상 피부에서 나타나는 입방형 (cuboidal)임을 확인하였다 (Figure 3). 더불어 표피가 더 두껍게 형성되어 기저층 (basal layer), 가시층 (spinous layer), 과립층 (granular layer)의 구분이 명확하였고, 골수 간엽 줄기세포를 이용한 인공피부에서는 뚜렷한 각질층 (horny layer) 또한 관찰할 수 있었다. 각질층의 이상각화증 (dyskeratosis)은 세 종류의 인공피부에서 모두 나타났으며, 표피와 진피의 경계부인 기저막은 섬유모세포를 이용한 인공피부에서 가장 얇게 염색되었다. 하지만, 염색된 진피 구성 세포의 개수나 진피 기질의 밀도 차이는 없었고, 따라서 진피에서 보이는 인공피부 간의 차이점을 발견하지는 못하였다.

3.2 유전자 발현 분석

앞서 확인한 인공피부의 차이점을 찾기 위해, 진피 세포로 이용한 섬유모세포, 지방 줄기세포, 골수 간엽 줄기세포의 유전자 발현을

보고자 대용량 mRNA sequencing 분석을 시행하였다. 그 결과, 섬유모세포 대비 골수 간엽 줄기세포에서 104개의 유전자가 증가하였고, 157개의 유전자가 감소하였으며, 지방 줄기세포에서는 81개의 유전자가 증가하였고, 137개의 유전자가 감소하였다 (Figure 4). 이 중 두 종류의 줄기세포에서 섬유모세포 대비 공통적으로 증가한 유전자는 31개였고, 감소한 유전자는 27개였다 (Table 1).

두 종류의 줄기세포에서 공통적으로 증가한 유전자 31개에 대해, 이들 유전자의 생물학적인 의미를 이해하고자 DAVID를 이용해 functional annotation clustering 및 enrichment analysis를 시행하였다. 클러스터링에 대한 classification stringency은 high로 설정 후 분석한 결과, 가장 높은 enrichment score를 가진 cluster는 EGF-like domain이었고, 두 번째로 높은 enrichment score를 나타낸 cluster는 EGF-like domain 중에서도 칼슘 결합과 관련된 것이었다 (Table 2).

줄기세포에서 공통적으로 증가한 유전자 31개와 감소한 유전자 27개에 대해 시행한 KEGG 분석 결과, 모두 51개의 연관된 생물학적 경로가 검색되었다 (data not shown). 이들 경로 중 창상 회복과 관련한 단백질인 activin A와 thrombospondin-1 유전자가 줄기세포의 신호전달 경로와 extracellular matrix (ECM)-receptor 상호작용에 각각 관여하며 향진되어 있음을 확인하였다 (Figure 5).

마지막으로 MeV를 이용하여 fold change가 유사한 유전자끼리 gene tree clustering 분석을 시행하였다 (Figure 6). Figure 6의 왼쪽에 보이는 tree의 길이는 Euclidean distance를 나타내고, 이러한 distance가 짧을수록 유전자 간의 발현이 비슷하다고 할 수 있다. 공통적으로 증가한 유전자들의 gene tree distance가 감소한 유전자들에

비해 짧고, 이것은 증가한 유전자들이 감소한 유전자들에 비해 더 비슷한 양상으로 발현함을 의미한다. 그리고 해당 유전자들의 fold change를 보면 지방 줄기세포 및 골수 간엽 줄기세포에서 매우 유사하며, 따라서 이 유전자들에 대한 두 종류 줄기세포의 발현양상이 비슷함을 확인하였다.

3.3 면역형광 염색 및 염색 강도 평가

인공피부의 표피 증식능을 보기 위해 PCNA와 p63으로 염색을 시행하였고, 분화능을 보기 위해 filaggrin과 loricrin을 염색하였으며, 기저막 및 진피를 평가하기 위해 integrin $\alpha 6$, integrin $\beta 1$ 그리고 type IV collagen 염색을 시행하였다. 그리고 창상 관련 표피 단백질로 잘 알려진 galectin-3와 -7, KEGG 경로 분석에서 유전자가 증가함을 확인한 activin A와 thrombospondin-1, 그리고 줄기세포에서 공통적으로 증가한 31개의 유전자 중 POSTN 및 HAS2이 각각 발현하는 창상 관련 단백질인 periostin과 hyaluronan synthase 2의 총 여섯 종류 단백 항체에 대해서도 염색을 시행하였다 (34-38).

세 종류의 인공피부에서 발현하는 단백 항체의 염색 강도를 비교한 평균값은 Table 3과 같다. 창상 치유 관련 단백질 중, galectin-7와 activin A는 줄기세포를 진피 세포로 한 인공피부의 표피에서 더 강하게 발현하였고, galectin-3는 발현양의 차이가 없었다 (Figure 7). 이미지 분석 결과 activin A는 진피에서도 강하게 발현하였고, 이는 진피 세포의 mRNA sequencing 결과와도 일치하였다 (Table 4). 사후검정 결과에서도 줄기세포를 기반으로 만든 두 종류의 인공피부

각각, 섬유모세포 기반의 인공피부보다 표피와 진피에서 activin A가 유의하게 많이 발현하였다 ($p < \frac{0.05}{3} = 0.017$). Hyaluronan synthase 2는 세 종류의 인공피부에서 약하게 발현하며 서로 발현 정도의 차이가 없었고, thrombospondin-1은 세 종류의 인공피부에서 모두 발현하지 않았다 (Figure 8). 한 가지 흥미로운 점은 mRNA sequencing에서 섬유모세포에 비해 유의하게 증가한 periostin이 지방 줄기세포로 배양한 인공피부에서는 거의 발현하지 않았다는 것인데 (Figure 8), 이는 배양 과정 중에 나타나는 지방 줄기세포의 특성 변화와 연관성이 있는 것으로 생각된다.

표피 증식 단백질인 PCNA와 p63은 섬유모세포로 배양한 인공피부에서 약한 발현 강도를 보였고, 두 종류의 줄기세포로 배양한 인공피부에서 대해서는 PCNA와 p63의 염색 양상이 서로 반대로 나타났다 (Figure 8). 지방 줄기세포 기반의 인공피부 표피에서는 PCNA 음성, p63 강양성의 발현 강도를 보였고, 골수 간엽 줄기세포 기반의 인공피부에서는 PCNA 강양성, p63 음성의 발현 양상을 보였다. 이미지 분석 결과를 이용한 사후검정에서도 PCNA는 골수 간엽 줄기세포 기반의 인공피부에서, p63은 지방 줄기세포 기반의 인공피부에서, 다른 두 종류의 인공피부와 각각 비교했을 때 유의하게 많이 발현하였다 ($p < \frac{0.05}{3} = 0.017$). 표피 분화 정도는 각질층의 두께에 대한 차이를 배제하면, 세 종류의 인공피부에서 모두 동일하게 나타났고 (Figure 9), filaggrin과 loricrin 염색 정도의 통계적인 유의성 차이도 없었다.

마지막으로 기저막의 형태를 보기 위해 integrin $\alpha 6$ 와 $\beta 1$ 를 염색한 결과, 줄기세포 기반의 인공피부에서 더 강하고 두껍게 나타났으며 특히 지방 줄기세포로 배양한 인공피부에서 가장 잘 만들어지는 양상을 보였다 (Figure 10). 특히 두 integrin은 사후검정 결과, 지방 줄기세포로 배양한 인공피부에서 다른 두 종류의 인공피부에 비해 유의하게 강한 발현을 보였으며 ($p < \frac{0.05}{3} = 0.017$). 이는 지방 줄기세포가 기저막의 형성에 긍정적인 영향을 미치는 것을 시사한다. 마지막으로 제4형 collagen은 섬유모세포 기반의 인공피부에서 약하게 발현하였고, 줄기세포 기반의 인공피부에서는 거의 발현하지 않았으며 통계적으로도 유의한 차이를 나타냈다. 이는 줄기세포에 비해 섬유모세포의 콜라겐 생성 능력이 우월하여 생긴 결과로 생각된다.

	Up-regulated (>4-fold)	Down-regulated (<0.25-fold)
Gene	ABI3BP	ADGRA2
	ADAM12	CHN1
	ADAMTSL1	COLEC12
	ANK3	CTSK
	APCDD1L	DHRS3
	CA12	DMKN
	COMP	FBLN1
	DSP	FBLN5
	EFEMP1	FCHO1
	FGFRL1	GALNT6
	HAS2	GPNMB
	INHBA	INPP4B
	KCNK2	MME
	LACC1	MMP3
	LOXL1	MTCL1
	MEST	MTUS1
	MICAL2	MXRA5
	MOK	MYO15B
	NPR3	NDRG2
	PDE1C	NES
	PLPP3	PRELP
	POSTN	RUNX1T1
	PRPS1	SEPP1
	RGS4	SPON2
	RIMS1	SVEP1
	SCUBE3	TBX3
	SEL1L3	TNS3
	SEMA7A	
	SRGN	
	TENM3	
	TM4SF1	

Table 1. List of differentially expressed genes in both types of stem cells

Annotation	Related function	Gene count	p-value
Cluster 1 with enrichment score 2.85			
UP_KEYWORDS	EGF-like domain	5	<0.001
INTERPRO	EGF-like domain	5	<0.001
INTERPRO	EGF-like, conserved site	4	0.004
SMART	EGF	4	0.007
Cluster 2 with enrichment score 1.65			
UP_SEQ_FEATURE	Domain: EGF-like 3; calcium-binding	3	0.002
UP_SEQ_FEATURE	Domain: EGF-like 2; calcium-binding	3	0.003
INTERPRO	EGF-like calcium-binding, conserved site	3	0.011
INTERPRO	EGF-like calcium-binding	3	0.017
INTERPRO	Insulin-like growth factor binding protein, N-terminal	3	0.02
SMART	EGF CA	3	0.028
GOTERM_MF_DIRECT	Calcium-binding	3	0.32
UP_KEYWORDS	Calcium	3	0.37
Cluster 3 with enrichment score 0.7			
UP_SEQ_FEATURE	Transmembrane region	12	0.11
UP_KEYWORDS	Transmembrane helix	12	0.17
UP_KEYWORDS	Transmembrane	12	0.18
GOTERM_CC_DIRECT	Integral component of membrane	10	0.49

Table 2. Functional annotation clustering of 31 up-regulated genes in both types of stem cells using Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)

EGF , epidermal growth factor; CA, calcium

Protein	Staining intensity score ^a			<i>p</i> -value	Main location
	Fb-based LSE	ADSC-based LSE	BMSC-based LSE		
Wound healing					
Galectin-3	0.17±0.41	0.17±0.41	0.17±0.41	1.000	E
Galectin-7	0.83±0.41	1.67±0.52	1.83±0.41	0.010	E
Activin A	0.33±0.52	2.83±0.41	2.50±0.55	0.001	E, D
HAS2	0.83±0.41	0.83±0.41	0.83±0.41	1.000	E
Thrombospondin-1	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	1.000	N/D
Periostin	2.00±0.00	0.17±0.41	2.17±0.41	0.000	E
Epidermal proliferation					
PCNA	0.83±0.41	0.00±0.00	2.17±0.41	0.000	E
p63	0.67±0.52	2.33±0.52	0.00±0.00	0.001	E
Epidermal differentiation					
Filaggrin	2.17±0.41	2.17±0.41	2.33±0.52	0.738	E
Loricrin	2.00±0.00	2.17±0.41	2.17±0.41	0.588	E
BM & D					
Integrin α6	1.00±0.00	2.67±0.52	1.67±0.52	0.001	BM
Integrin β1	1.17±0.41	2.67±0.52	1.50±0.55	0.004	BM
Type IV collagen	1.00±0.00	0.00±0.00	0.17±0.41	0.001	BM, D

Table 3. Quantitative scoring of immunofluorescence staining

Fb, fibroblast; LSE, living skin equivalent; ADSC, adipose-derived stem cell; BMSC, bone marrow mesenchymal stem; HAS2, hyaluronan synthase 2; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; E, epidermis; D, dermis; BM, basement membrane; N/D, not detected

^aScores were based upon staining intensity of the mainly expressed area of the protein. 0, none; 1, weak; 2, moderate; 3, strong

Protein	Signal intensity ^a			<i>p</i> -value	Main location
	Fb-based LSE	ADSC-based LSE	BMSC-based LSE		
Galectin-7	38.5±17.6	48.8±26.6	55.7±33.8	0.006	E
Activin A	26.7±12.9	137.5±35.4	112.8±33.9	0.002	E
Activin A	2.7±2.0	16.8±6.7	20.9±8.1	0.006	D
Periostin	76.8±35.6	N/D	82.3±42.5	0.000	E
PCNA	16.7±7.6	N/D	43.9±12.2	0.000	BL
p63	5.1±3.2	35.6±10.1	N/D	0.000	BL
Integrin α6	27.3±13.5	160.3±68.5	90.2±39.3	0.004	BM
Integrin β1	31.0±10.2	128.0±45.6	70.8±28.9	0.002	BM
Type IV collagen	42.8±20.5	N/D	N/D	0.001	BM

Table 4. Signal intensity comparison of the level of protein expression using image analysis.

Fb, fibroblast; LSE, living skin equivalent; ADSC, adipose-derived stem cell; BMSC, bone marrow mesenchymal stem; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; E, epidermis; D, dermis; BM, basement membrane; BL, basal layer; N/D, not detected

^aSignal intensity was calculated and presented as an arbitrary unit.

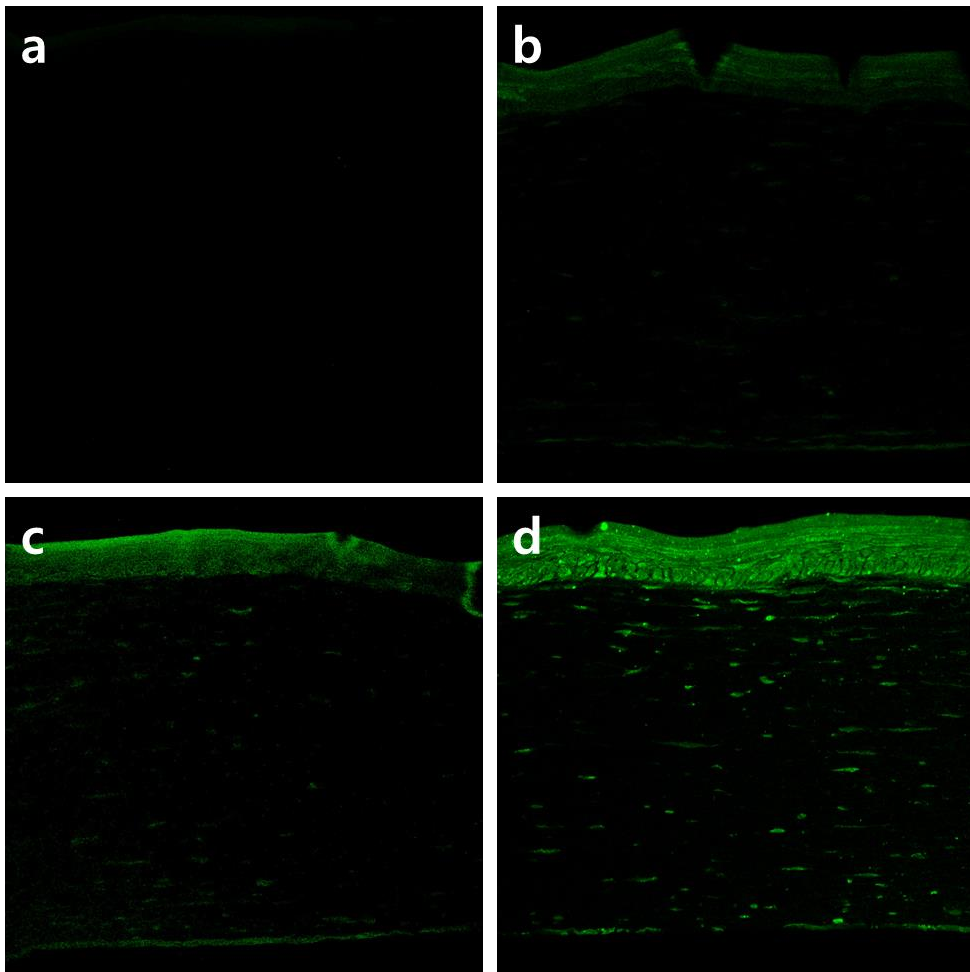


Figure 1. Examples of immunofluorescent staining for the skin equivalent. (a) Score=0. There is no immunofluorescent staining. (b) Score=1. Weak immunofluorescent staining. (c) Score=2. Moderate immunofluorescent staining. (d) Score=3. Strong immunofluorescent staining. Original magnification: 200X in a-d.

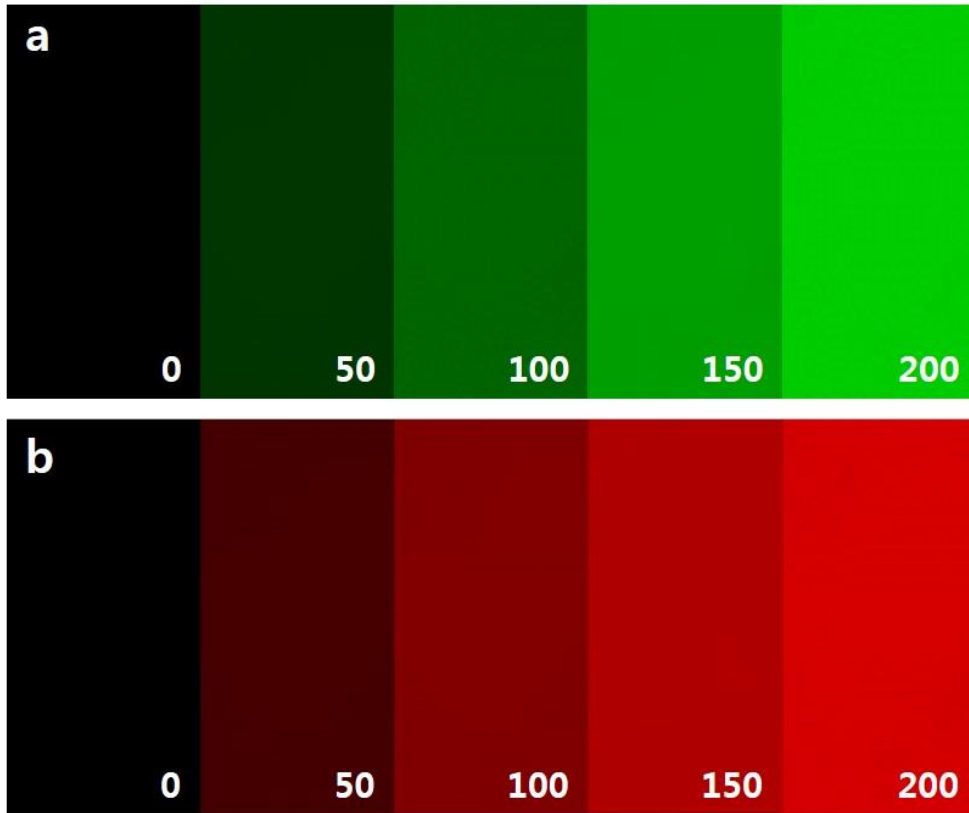


Figure 2. The profile of color density shown with an arbitrary unit, which was used in image analysis. (a) Green and (b) red.

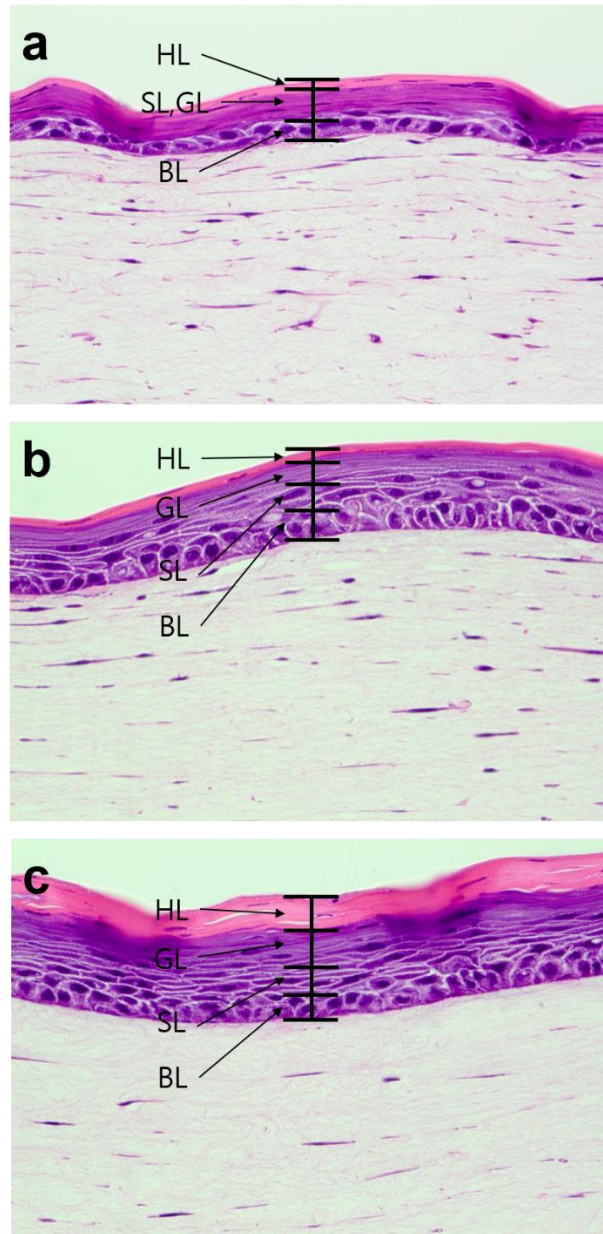


Figure 3. Living skin equivalents using fibroblasts (a), adipose-derived stem cells (b) and bone marrow mesenchymal stem cells (c) (hematoxylin and eosin, original magnification, X400). The granular layer is identifiable in (b) and (c).

HL, horny layer; GL, granular layer; SL, spinous layer; BL, basal layer

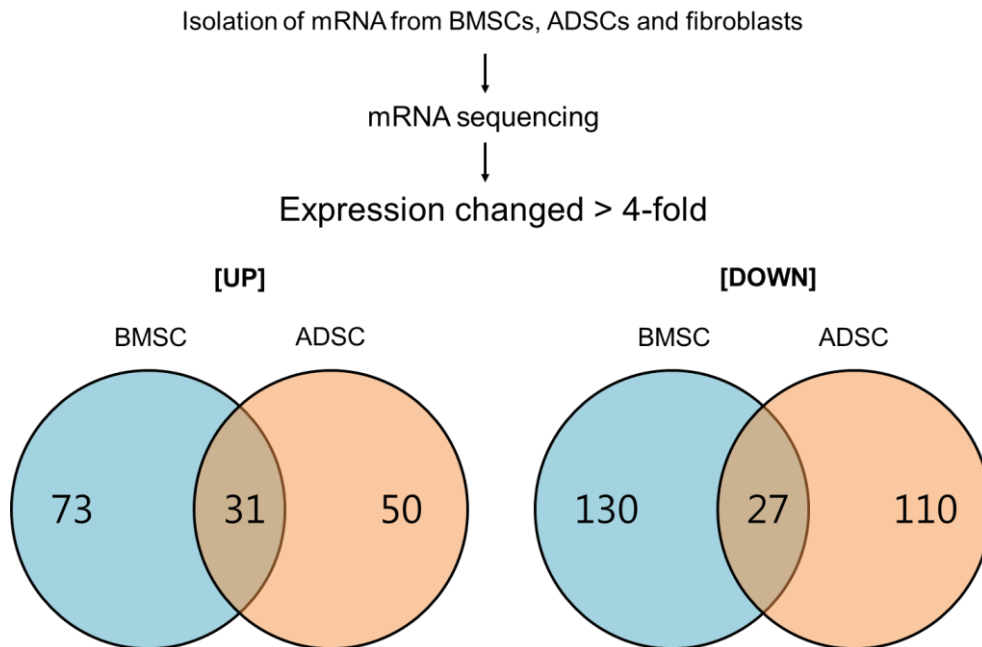


Figure 4. Comparison of gene expression. Diagram shows the summary of expressions of total mRNA sequences. A total of 58 up- and down-regulated genes of both stem cells were observed.

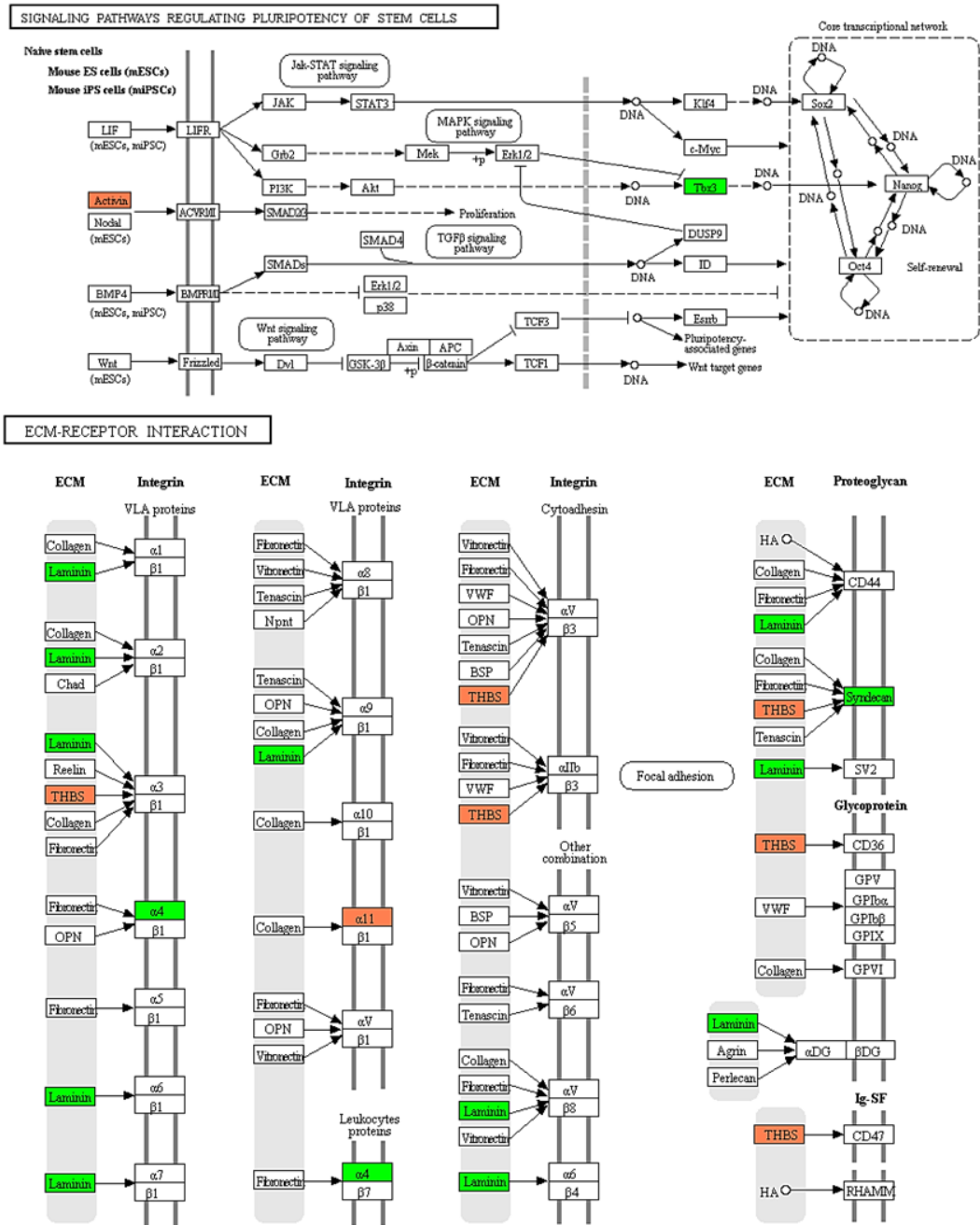


Figure 5. Two highly expressed wound healing related genes in stem cells were found by Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis. Increased genes, activin and THBS (thrombospondin-1), are shown in coral-red colored boxes. Decreased genes are shown in green colored boxes.

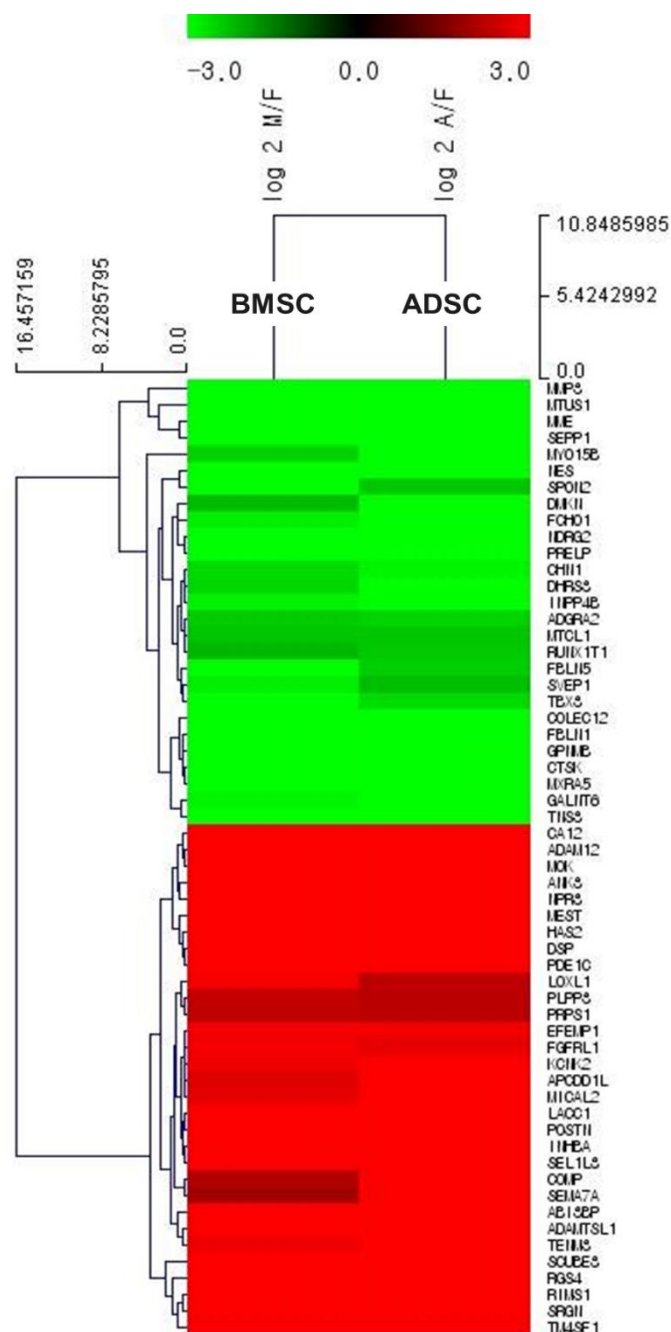


Figure 6. Hierarchical clustering results. The gene expression level is indicated by red for high expression and green for low expression compared to fibroblasts. Cluster relationships are indicated by tree-like structures left to the heat map.

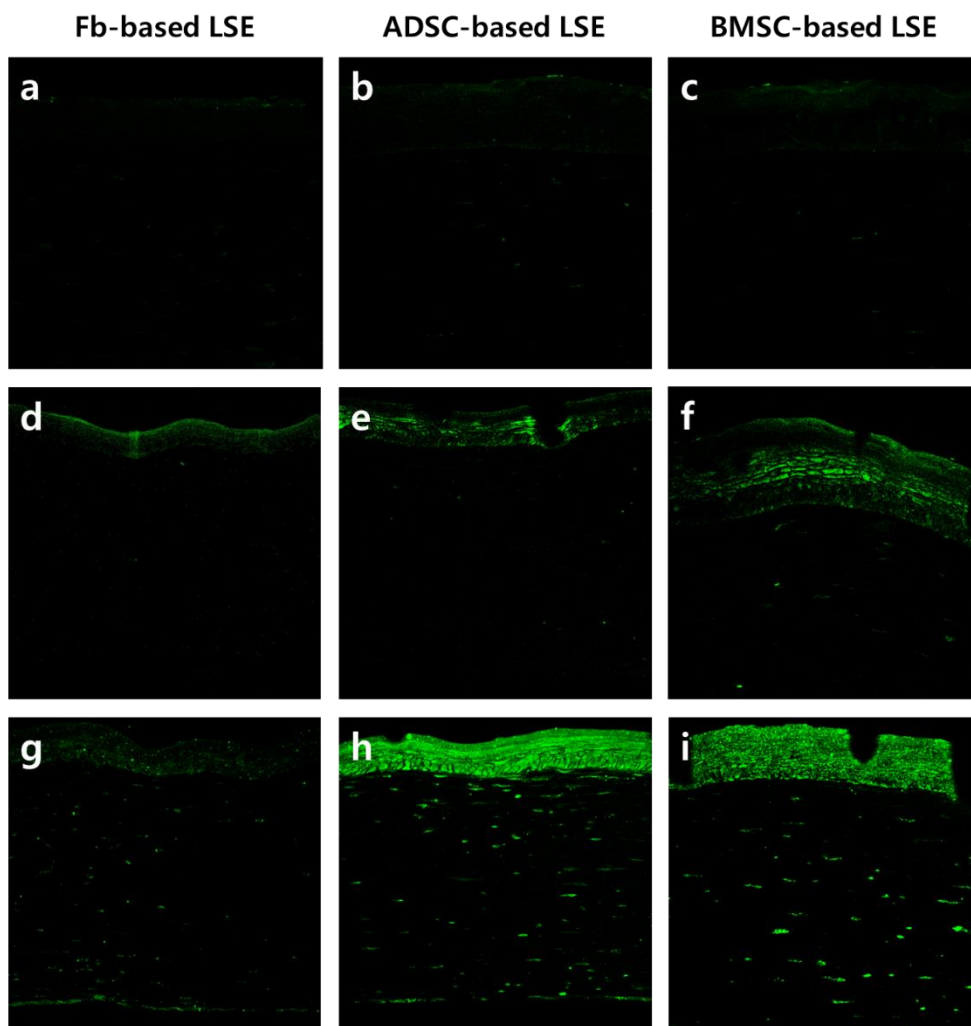


Figure 7. Sections of LSEs were immunofluorescent stained for galectin-3 (a, b, and c), galectin-7 (d, e, and f), and activin A (g, h, and i). Original magnification: 200X in a-i.

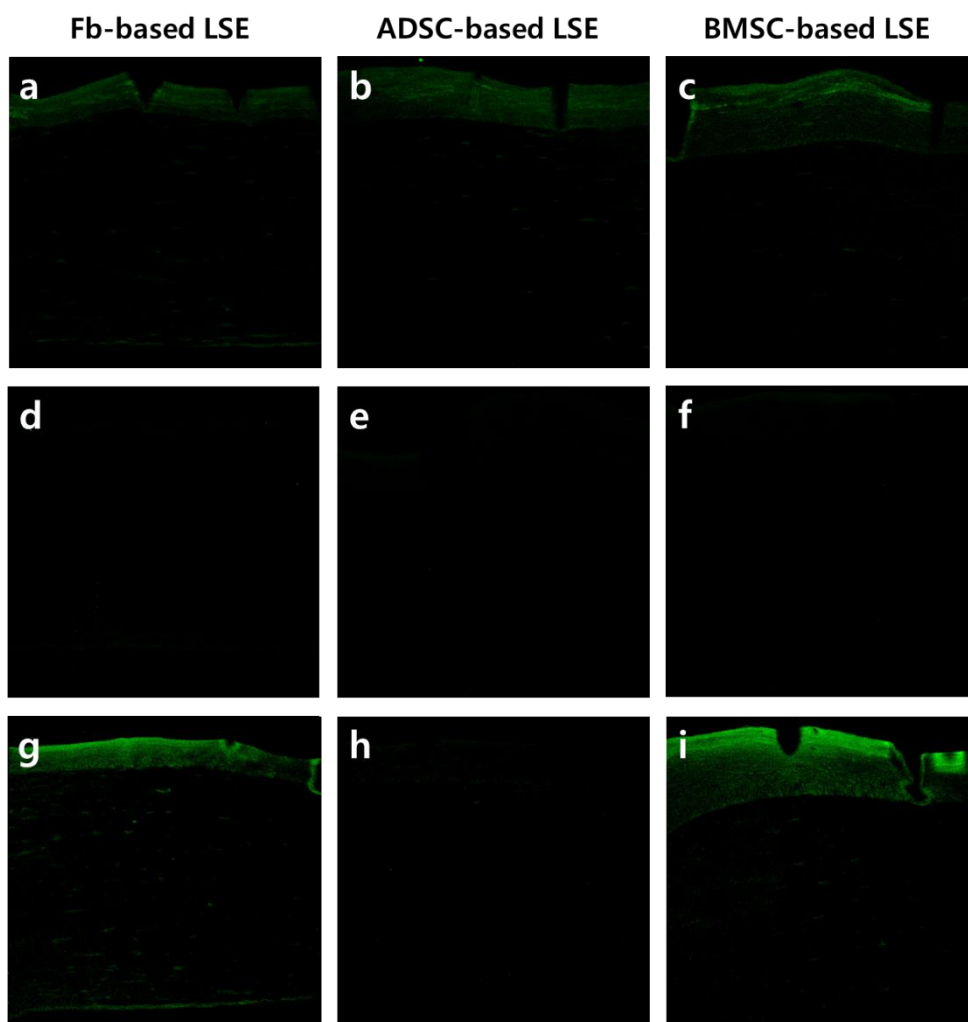


Figure 8. Sections of LSEs were immunofluorescent stained for HAS2 (a, b, and c), thrombospondin-1 (d, e, and f), and periostin (g, h, and i). Original magnification: 200X in a-i.

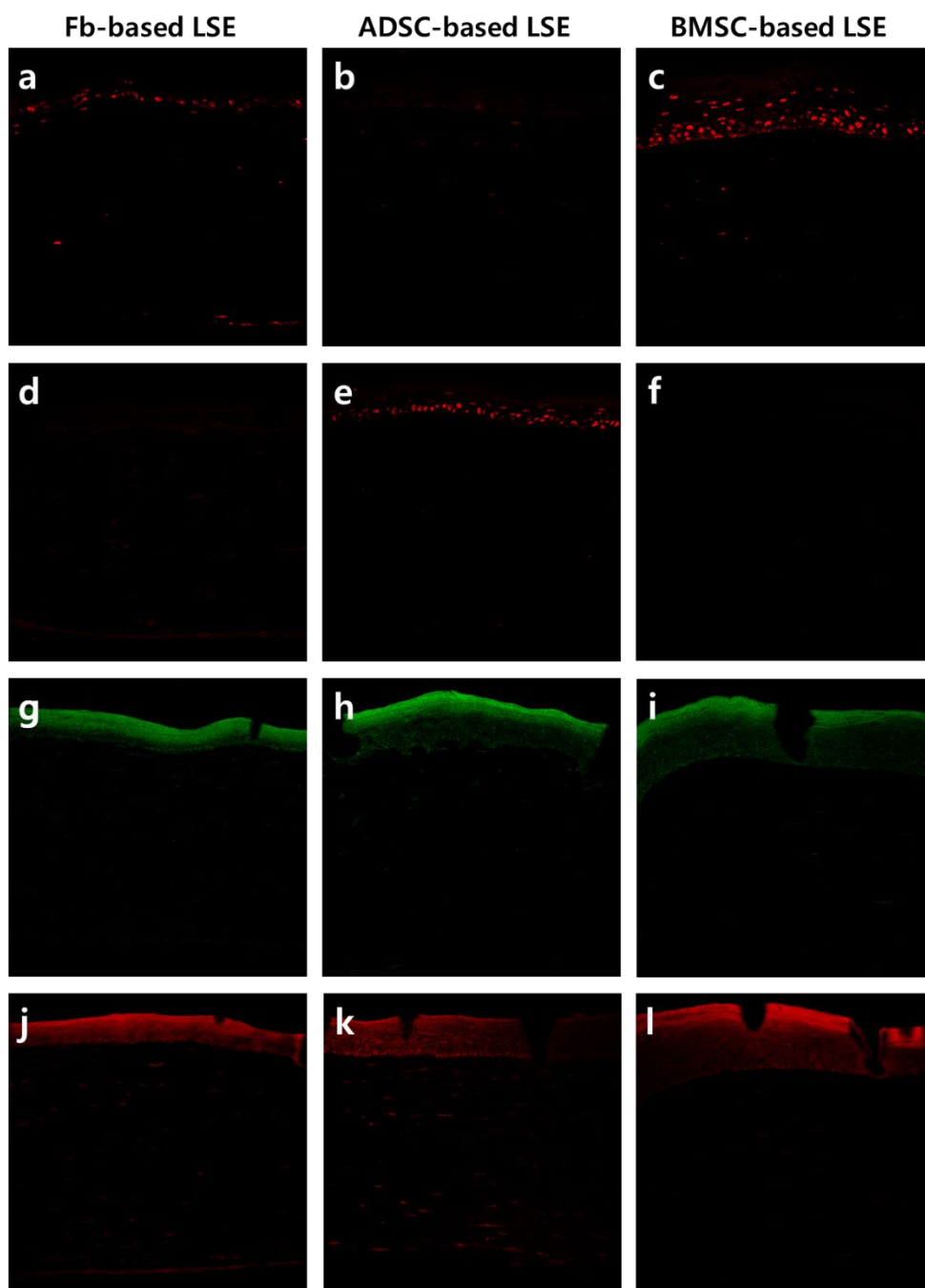


Figure 9. Sections of LSEs were immunofluorescent stained for PCNA (a, b, and c), p63 (d, e, and f), filaggrin (g, h, and i), and loricrin (j, k and l). Original magnification: 200X in a-l.

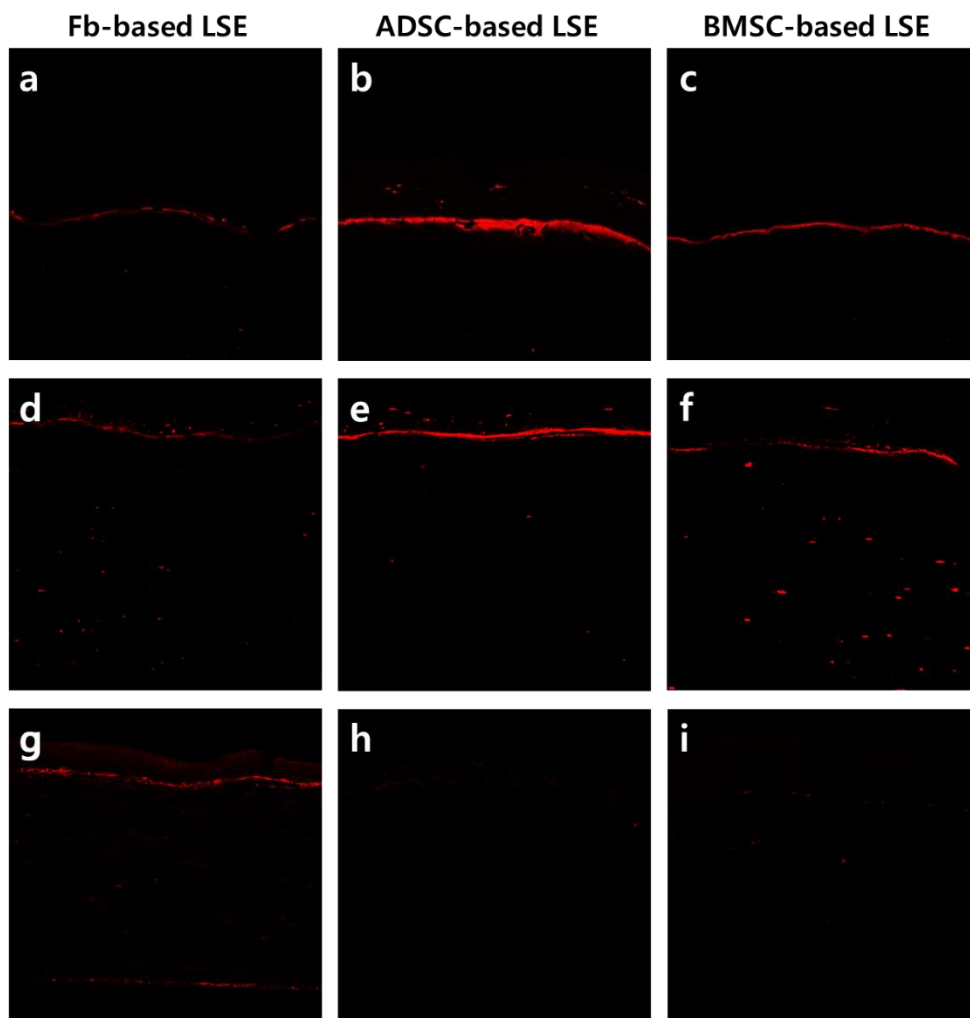


Figure 10. Sections of LSEs were immunofluorescent stained for integrin $\alpha 6$ (a, b, and c), integrin $\beta 1$ (d, e, and f), and type IV collagen (g, h, and i). Original magnification: 200X in a-i.

IV. 고 찰

본 연구에서는 창상 치유 과정에서 성체 줄기세포가 표피의 재생에 미치는 영향을 알아보기 위해 줄기세포를 이용한 3 차원 인공피부 모델을 구현하고 진피의 줄기세포와 표피의 각질형성세포가 주고받는 상호 작용을 규명하고자 하였다. 인공피부가 만들어지는 과정은 실제 창상 회복 과정과 유사하다고 알려져 있으므로 (5,7,39), 섬유모세포를 대신하여 지방 줄기세포 및 골수 간엽 줄기세포를 진피 대용물 (dermal equivalent)에 첨가하여 인공피부를 만들고 이들을 서로 비교한다면, 인공피부 배양 중에 발생하는 진피-표피 상호작용으로 줄기세포가 표피 재생에 미치는 영향 및 창상 치유를 촉진하는 기전을 알 수 있을 것이라 생각하였다.

성체 줄기세포를 이용하여 배양한 인공피부는 섬유모세포를 이용했을 때와 비교할 때, 더 정상 피부에 가까운 양상을 보였다. H&E 염색 결과 입방형의 각질형성세포가 기저층에 조밀하게 분포하였고, 표피 또한 두껍게 형성되어 성체 줄기세포를 기반으로 만든 인공피부의 표피 증식이 더 활발함을 확인하였다. 성체 줄기세포 기반의 인공피부가 더 두껍고 정상 피부와 유사한 이유는, clustering 및 enrichment analysis 결과 성체 줄기세포에서 더 많이 증가한 유전자 군이 EGF-like domain 클러스터로 분류된 것과 연관지어 생각해 볼 수 있다. EGF는 EGF 수용체와 결합하여 각질형성세포의 증식을 조절하고 세포의 생존 기간을 연장시키며 세포 이동에도 관여함으로써 표피의 형성에 매우 중요한 역할을 한다 (40). 따라서 EGF-like domain

클러스터로 분류된 유전자로부터 발현되는 단백질이 각질형성세포의 EGF 수용체와 결합한 후 표피의 성장을 촉진할 가능성을 생각해 볼 수 있고, EGF-like domain을 가진 단백질이 실제로 표피의 성장을 촉진시킨 연구 결과도 이미 보고된 바 있다 (41,42).

기저막은 성체 줄기세포 기반의 인공피부에서 더 뚜렷하게 관찰되었다. 이는 기저막 구성 단백질인 integrin $\alpha 6$ 와 integrin $\beta 1$ 의 면역형광 염색에서도 확인할 수 있었는데, 지방 줄기세포와 함께 배양한 인공피부의 기저막에서 integrin이 특히 강하게 발현하였다. mRNA 시퀀싱 결과 세 종류의 진피 구성 세포가 발현하는 integrin 유전자의 발현양 차이가 없었고, integrin의 ligand인 laminin도 성체 줄기세포의 KEGG 경로 분석에서 오히려 감소한 것으로 보아 (Figure 4), 성체 줄기세포 기반의 인공피부 기저막에서 integrin이 강하게 발현하는 것은 이들 단백질이 단순히 세포로부터 분비되기 보다는 성체 줄기세포가 갖는 항산화 효과로 인한 표피-진피 상호작용의 결과로 생각된다. 표피의 각질형성세포에 항산화제를 투여하면, 각질형성세포가 활성화되고 증식한다는 사실은 잘 알려져 있으며 (43,44), Coenzyme Q10 및 비타민 C, E와 같은 항산화 물질은 기저막 구성 단백질의 발현을 증가시키고 기저막 형성에도 도움을 준다 (45,46). 따라서 성체 줄기세포를 기반으로 만든 인공피부에서 기저막 구성 단백질이 잘 발현되고 기저막 구조 또한 뚜렷하게 형성되는 이유는, 성체 줄기세포 또는 그로부터 분화한 세포들이 분비하는 다양한 항산화 매개물질의 근거리 분비 효과 (paracrine effect)로 인해 각질형성세포와의 상호작용으로 실제 피부에 더 가까운 기저막을 만드는 것으로 추정된다 (47,48). 기저막 및 진피 구성 물질 중에 하나인 type IV collagen은

섬유모세포 기반의 인공피부에서만 약하게 발현하는 양상이었는데, 이는 섬유모세포가 성체 간엽 줄기세포에 비해 기능적으로 조금 더 분화된 상태에서 ECM을 비롯한 콜라겐 생성 능력이 우월하여 생기는 결과로 보인다.

기저층 각질형성세포의 증식 능력을 나타내는 표지자인 PCNA와 p63에 대한 염색 결과는 매우 흥미로웠다. 섬유모세포를 기반으로 만든 인공피부에서는 PCNA와 p63이 약하게 발현하였고, 지방 줄기세포를 기반으로 만든 인공피부는 PCNA(-)p63(+)인 각질형성세포가, 골수 간엽 줄기세포를 기반으로 만든 인공피부는 PCNA(+)p63(-)인 각질형성세포가 관찰되었다. 지방 줄기세포 기반의 인공피부에서 위와 같은 표피 염색 패턴이 나타나는 것은 기존의 연구결과와 일치하는 양상이었다 (49). PCNA는 DNA 중합효소의 보조 인자 (cofactor)로써 DNA 복제와 관련된 여러 기능들을 통합적으로 조절하며 DNA 손상 복구 및 세포사멸과도 연관되어 있는 단백질이다 (50). 세포분열 주기 중 S기 (synthesis phase)가 끝나면 급격히 감소하고, 따라서 세포의 종류와는 무관하게 활발하게 증식하는 세포에서 잘 발현한다 (51). 반면 p63은 표피의 발달과 증식에 필수적인 전사 인자로 줄기세포에서 주로 발현하고 각질형성세포의 분화 및 기저막 형성에도 필요한 단백질로 알려져 있다 (52,53). 본 연구 결과, Figure 8의 filaggrin 및 loricrin 염색에서 나타나듯이, 세 종류의 인공피부에서 나타나는 PCNA 및 p63의 발현 차이가 표피의 분화에는 큰 영향을 주지 않는 것으로 판단된다. 하지만 골수 간엽 줄기세포 기반의 인공피부에서는 가장 두꺼운 표피가 만들어 졌고 (Figure 3), 지방 줄기세포 기반의 인공피부에서는 가장 완성도 높은 기저막이 형성되었으므로 (Figure

10), PCNA는 주로 표피의 두께와 연관성이 있다고 생각되며, 기저막의 완성도는 p63과 관련성이 있는 것으로 보인다. 더불어, 두 종류의 성체 줄기세포로 만든 인공피부가 전혀 다른 기저층 염색결과를 보이는 것은, 같은 간엽 줄기세포라도 분비하는 사이토카인이 서로 다르고 주변 세포에 미치는 영향이 다를 수 있음을 시사하며, 진피의 구성세포에 따라 진피-표피 상호작용에 의해 표피가 어떻게 달라질 수 있는지 잘 보여준다고 할 수 있다 (19).

면역형광 염색을 시행한 6종의 창상 관련 단백질 (galectin-3, galectin-7, activin A, hyaluronan synthase 2, thrombospondin-1, and periostin) 중, 세 종류의 인공피부에서 서로 유의한 차이가 있는 단백질은 galectin-7, activin A, 그리고 periostin이었다. Galectin은 β -galactoside-binding lectin의 한 종류이며 창상 회복에서 중요한 단백질로 알려져 있다. 현재까지 모두 15종의 galectin이 발견되었고, galectin-3과 -7은 표피에서 창상이 발생했을 때 기저층에 있는 각질형성세포의 이동 및 재생에 관여한다. 이 중 galectin-7은 표피에서 주로 발현하는 단백질로 각질형성세포의 활성도를 나타내는 표지자이며 (54,55), 외부에서 주입했을 때 표피 재생을 더욱 촉진하는 것으로 보고되어 galectin-3보다 창상 회복에 더욱 직접적인 영향을 미치는 것으로 판단된다 (56-59). 현재까지 인공피부를 galectin으로 염색한 연구결과를 보고한 문헌은 없었고, galectin-3과 -7을 서로 다른 조건으로 배양한 인공피부에 대해 면역형광염색을 시행한 결과, 표피의 증식 능력과 각질형성세포의 분화 능력이 더 뛰어난 인공피부에서만 galectin-7이 발현되고 galectin-3은 전혀 발현하지 않았다 (28). 본 연구에서도 galectin-3은 세 종류의 인공피부에서

거의 발현하지 않았고, galectin-7은 성체 줄기세포를 기반으로 만든 인공피부의 표피에서 더 강하게 발현하였다. 이러한 결과는 만약 성체 줄기세포를 이용하여 만든 인공피부를 결손부 재건을 위해 사용한다면, 섬유모세포 기반의 인공피부를 사용할 때보다 창상 치유 속도가 더 촉진될 가능성을 뒷받침하는 것이다.

Periostin은 90kDa의 ECM 단백질로, osteoblast-specific factor이며, 피부의 창상 회복 과정에서 fibronectin과 함께 표피에서도 발현한다고 알려져 있다 (60). mRNA 시퀀싱 결과, 성체 줄기세포에서 유의하게 증가한 창상 관련 유전자 중에 하나로 분석되어, 세 종류 인공피부에 대해 해당 단백질의 면역형광 염색을 시행했으나, 흥미롭게도 지방 줄기세포에서 만들어진 인공피부에서는 표피 및 진피에서 전혀 발현하지 않았다. 이러한 이유는 지방 줄기세포가 처음에는 periostin을 발현하다가 인공피부의 배양과정을 거치며 더 이상 발현하지 않을 가능성을 고려해 볼 수 있는데, 이는 다른 종류의 줄기세포에 비해 지방 줄기세포가 골조직으로 잘 분화하지 않는 것과 연관성이 있는 것으로 추측된다 (61,62). 하지만 진피 뿐만 아니라 표피에서도 이러한 차이가 확인한 것은 진피를 구성하는 지방 줄기세포가 진피-표피 상호작용으로 표피의 periostin 분비까지 억제할 가능성이 있다고 생각되며, 이러한 이유에 대해서는 향후 더 많은 연구가 필요할 것으로 보인다.

Thrombospondin-1과 hyaluronan synthase-2는 mRNA 시퀀싱 분석에서 유의한 차이를 보인 창상 관련 단백질이었으나, 실제로 면역형광 염색을 시행했을 때는 발현이 미미하거나 인공피부 간의 차이가 나타나지 않았다. 따라서 본 연구에서 시행한 인공피부 모델에서

두 단백질이 창상 회복에 유의한 도움을 준다고 판단하기는 어려우며, 면역형광 염색에서 위 단백질의 발현이 잘 안 된 이유는 periostin이 지방 줄기세포를 기반으로 만든 인공피부에서 발현하지 않은 이유와 유사하게 추정할 수 있을 것이다. 즉, 인공피부의 배양과정에서 진피 구성 세포가 변화 과정을 거치며 더 이상 이들 단백질을 발현하지 않는 가능성과, mRNA sequencing 결과와 실제 단백질의 발현 정도의 불일치에 대한 가능성이 있다 (63,64).

Activin A는 mRNA 시퀀싱 분석에서 지방 줄기세포와 골수 줄기세포에서 섬유모세포 대비 공통적으로 증가하였고, 성체 줄기세포를 기반으로 만든 인공피부의 면역형광 염색에서도 표피와 진피에서 유의하게 많이 발현됨을 확인한 단백질이다 (Table 4). Activin A는 두 개의 inhibin β A subunits가 disulfide 결합을 이루어 만든 homodimer이며, activin을 구성하는 다른 inhibin subunit 유전자들 중에 INHBA (inhibin β A 유전자)를 제외하고는 성체 줄기세포에서 유의하게 증가한 것이 없으므로, KEGG 경로 분석 결과 activin A만 향진된 것으로 나타났다. 창상 회복에 중요한 역할을 하는 단백질로 알려진 activin A는 transmembrane receptor serine/threonine kinase를 통해 다양한 생물학적 효과를 일으키며 길항제인 follistatin에 의해 억제된다 (65). 쥐를 대상으로 한 연구에서 진피에 영향을 미쳐 건강한 육아 조직의 형성을 돕고, 표피에서는 재상피화를 촉진하고 각질형성세포의 이동을 돕는 것으로 보고된 바 있다 (66,67). 또한 모발의 재생주기와의 밀접한 관련이 있어 (68), 피부 및 피부 부속기의 항상성 유지에도 중요한 단백질로 알려져 있다. Activin A는 골수 간엽 줄기세포 및 각질형성세포 등에서 많이 만들어지며 (69,70), 피부 창상

회복 모델 구현을 위해 이번 연구에서 배양한 인공피부에서도 일치하는 결과를 보였다. 창상 회복의 초기 단계인 재상피화가 효과적으로 이루어지려면, 각질형성세포와 섬유모세포의 crosstalk가 중요한데 이를 위해서는 matrix metalloproteinase와 TGF- β signaling이 잘 조절되어야 함이 보고된 바 있다 (71). Transforming growth factor (TGF)- β superfamily에 속하는 activin A는 세포 외에 존재하고 세포막 수용체와 결합 후 TGF- β 매개 신호 전달 과정을 활성화하여 재상피화에 관여하는 것으로 보인다. 본 연구결과에서 알 수 있듯이, 진피의 성체 줄기세포에서 만들어진 activin A는 근거리 분비 효과 (paracrine effect)를 통해 각질형성세포에 영향을 주어 더 많은 activin A를 발현하도록 하고 완성도가 더 높은 인공피부를 만드는데 기여하며, 각질형성세포가 만드는 activin A는 다시 진피에 영향을 주어, 진피-표피의 상호작용의 선순환을 연결하는 중요한 매개 단백질로 추정된다.

V. 결 론

연구자는 창상 회복 과정에서 나타날 수 있는 성체 간엽 줄기세포의 효과 및 진피-표피 상호작용을 확인하기 위해, 이들 줄기세포를 이용한 3차원 인공피부 모델을 제작하고 이를 섬유모세포로 만든 인공피부와 서로 비교해 보았다. 그 결과, 성체 줄기세포에서 증가한 EGF-like domain 클러스터에서 발현하는 단백질과 성체 줄기세포가 가지는 항산화 효과에 의해 표피 재생 및 기저막 형성이 촉진되고, 나아가 기저층 각질형성세포의 특성차이를 유발하는 것으로 생각된다. Galectin-7은 성체 줄기세포의 표피-진피 상호작용으로 표피에서 더 많이 발현하는 창상 관련 단백질로 확인되었다. Activin A는 성체 줄기세포로 배양한 인공피부의 표피와 진피에서 발현하며 완성도가 높은 인공피부를 형성하는데 역할을 하며, 근거리 분비 효과 (paracrine effect)를 통해 창상회복에 있어 표피-진피의 상호작용에 중요한 매개 단백질로 판단된다. 그러나 이들 단백질에 대한 실제적인 임상 적용을 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것이다.

참 고 문 헌

1. Demayo F, Minoo P, Plopper CG, Schuger L, Shannon J, Torday JS. Mesenchymal-epithelial interactions in lung development and repair: are modeling and remodeling the same process? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Sep;283(3):L510-517.
2. Ootani A, Toda S, Fujimoto K, Sugihara H. Foveolar differentiation of mouse gastric mucosa in vitro. *Am J Pathol*. 2003 Jun;162(6):1905-12.
3. Tomlinson A, Ferguson MWJ. Wound healing: a model of dermal wound repair. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2003;225:249-60.
4. el-Ghalbzouri A, Gibbs S, Lamme E, Van Blitterswijk CA, Ponc M. Effect of fibroblasts on epidermal regeneration. *Br J Dermatol*. 2002 Aug;147(2):230-43.
5. Green H, Rheinwald JG, Sun TT. Properties of an epithelial cell type in culture: the epidermal keratinocyte and its dependence on products of the fibroblast. *Prog Clin Biol Res*. 1977;17:493-500.
6. El Ghalbzouri A, Ponc M. Diffusible factors released by fibroblasts support epidermal morphogenesis and deposition of basement membrane components. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*. 2004 Jun;12(3):359-67.
7. Spiekstra SW, Breetveld M, Rustemeyer T, Scheper RJ, Gibbs S. Wound-healing factors secreted by epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts in skin substitutes. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*. 2007 Oct;15(5):708-17.
8. Chen Z, Wang Y, Shi C. Therapeutic Implications of Newly Identified Stem Cell Populations From the Skin Dermis. *Cell Transplant*. 2015;24(8):1405-22.
9. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002 Dec;13(12):4279-95.
10. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet*. 1987 May;20(3):263-72.
11. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*. 1974;2(2):83-92.
12. Becker AJ, McCULLOCH EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal

nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963 Feb 2;197:452–4.

13. Song L, Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2004 Jun;18(9):980–2.
14. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143–7.
15. Kørbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med*. 2003 Aug 7;349(6):570–82.
16. Kawamoto A, Asahara T, Losordo DW. Transplantation of endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Cardiovasc Radiat Med*. 2002 Dec;3(3–4):221–5.
17. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal Stem Cells Are Recruited into Wounded Skin and Contribute to Wound Repair by Transdifferentiation into Multiple Skin Cell Type. *J Immunol*. 2008 Feb 15;180(4):2581–7.
18. Lee DE, Ayoub N, Agrawal DK. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7:37.
19. Strioga M, Viswanathan S, Darinkas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev*. 2012 Sep 20;21(14):2724–52.
20. Sugihara H, Toda S, Yonemitsu N, Watanabe K. Effects of fat cells on keratinocytes and fibroblasts in a reconstructed rat skin model using collagen gel matrix culture. *Br J Dermatol*. 2001 Feb;144(2):244–53.
21. Mertsching H, Weimer M, Kersen S, Brunner H. Human skin equivalent as an alternative to animal testing. *GMS Krankenhaushygiene Interdiszip [Internet]*. 2008 Mar 11 [cited 2017 Jan 9];3(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2831516/>
22. Faller C, Bracher M, Dami N, Roguet R. Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA*. 2002 Oct;16(5):557–72.
23. Gay R, Swiderek M, Nelson D, Ernesti A. The living skin equivalent as a model in vitro for ranking the toxic potential of dermal irritants. *Toxicol In Vitro*. 1992 Jul 1;6(4):303–15.
24. Nickoloff BJ, Turka LA, Mitra RS, Nestle FO. Direct and indirect control of T-cell activation by keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 1995 Jul;105(1 Suppl):25S–29S.

25. Choi H-R, Nam K-M, Kim D-S, Huh C-H, Na J-I, Park K-C. Cervi cornus Colla (deer antler glue) induce epidermal differentiation in the reconstruction of skin equivalents. *Int J Cosmet Sci.* 2013 Jun;35(3):281–5.
26. Choi H-R, Nam K-M, Lee H-S, Yang S-H, Kim Y-S, Lee J, et al. Phlorizin, an Active Ingredient of *Eleutherococcus senticosus*, Increases Proliferative Potential of Keratinocytes with Inhibition of MiR135b and Increased Expression of Type IV Collagen, Phlorizin, an Active Ingredient of *Eleutherococcus senticosus*, Increases Proliferative Potential of Keratinocytes with Inhibition of MiR135b and Increased Expression of Type IV Collagen. *Oxidative Med Cell Longev* 2016 Mar 6;2016, 2016:e3859721.
27. Kim J, Jeong H-S, Li H, Baek KJ, Kwon NS, Yun H-Y, et al. Effects of Cervi cornus Colla (deer antler glue) in the reconstruction of a skin equivalent model. *Arch Dermatol Res.* 2013 Jan;305(1):85–9.
28. Choi JW, Nam KM, Choi HR, Lee DH, Huh CH, Park KC. Decreased galectin-3 and -7 expressions in old-aged skin and their differential expression in skin equivalents. [*Ann Dermatol*];
29. Functional Annotation Tool [Internet]. DAVID Bioinformatics Resources 6.8. Available from: https://david.ncifcrf.gov/content.jsp?file=functional_annotation.html
30. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4(1):44–57.
31. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37(1):1–13.
32. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [Internet]. 2017. Available from: http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway2.html
33. MeV [Internet]. [cited 2017 Feb 14]. Available from: <http://mev.tm4.org/#/welcome>
34. Conway SJ, Izuhara K, Kudo Y, Litvin J, Markwald R, Ouyang G, et al. The role of periostin in tissue remodeling across health and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2014 Apr 1;71(7):1279–88.
35. Walker JT, McLeod K, Kim S, Conway SJ, Hamilton DW. Periostin as a multifunctional modulator of the wound healing response. *Cell Tissue Res.* 2016 Sep;365(3):453–65.
36. Karvinen S, Pasonen-Seppänen S, Hyttinen JMT, Pienimäki J-P, Törrönen K, Jokela TA, et al. Keratinocyte growth factor stimulates migration and hyaluronan synthesis in the epidermis by activation of keratinocyte hyaluronan synthases 2 and 3. *J Biol Chem.* 2003 Dec 5;278(49):49495–504.
37. Pienimäki JP, Rilla K, Fulop C, Sironen RK, Karvinen S, Pasonen S, et al.

- Epidermal growth factor activates hyaluronan synthase 2 in epidermal keratinocytes and increases pericellular and intracellular hyaluronan. *J Biol Chem*. 2001 Jun 8;276(23):20428–35.
38. Wang Y, Lauer ME, Anand S, Mack JA, Maytin EV. Hyaluronan synthase 2 protects skin fibroblasts against apoptosis induced by environmental stress. *J Biol Chem*. 2014 Nov 14;289(46):32253–65.
 39. El Ghalbzouri A, Hensbergen P, Gibbs S, Kempenaar J, van der Schors R, Ponc M. Fibroblasts facilitate re-epithelialization in wounded human skin equivalents. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. 2004 Jan;84(1):102–12.
 40. Mimeault M, Bonenfant D, Batra SK. New advances on the functions of epidermal growth factor receptor and ceramides in skin cell differentiation, disorders and cancers. *Skin Pharmacol Physiol*. 2004 Aug;17(4):153–66.
 41. Huang Y-H, I C-C, Kuo C-H, Hsu Y-Y, Lee F-T, Shi G-Y, et al. Thrombomodulin Promotes Corneal Epithelial Wound Healing. *PLoS ONE* [Internet]. 2015 Mar 27 [cited 2017 Jan 16];10(3). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4376916/>
 42. Swindle CS, Tran KT, Johnson TD, Banerjee P, Mayes AM, Griffith L, et al. Epidermal growth factor (EGF)-like repeats of human tenascin-C as ligands for EGF receptor. *J Cell Biol*. 2001 Jul 23;154(2):459–68.
 43. El Ghalbzouri A, Jonkman MF, Dijkman R, Ponc M. Basement membrane reconstruction in human skin equivalents is regulated by fibroblasts and/or exogenously activated keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2005 Jan;124(1):79–86.
 44. Wha Kim S, Lee I-W, Cho H-J, Cho K-H, Han Kim K, Chung J-H, et al. Fibroblasts and ascorbate regulate epidermalization in reconstructed human epidermis. *J Dermatol Sci*. 2002 Dec;30(3):215–23.
 45. Muta-Takada K, Terada T, Yamanishi H, Ashida Y, Inomata S, Nishiyama T, et al. Coenzyme Q10 protects against oxidative stress-induced cell death and enhances the synthesis of basement membrane components in dermal and epidermal cells. *BioFactors Oxf Engl*. 2009 Oct;35(5):435–41.
 46. Yoon HJ, Shin JW, Kim YK, Kim JE, Cho KH. The Effect of Vitamin C and E on the Expression of the Cutaneous Basement Membrane Components. *Korean J Invest Dermatol*. 2007;14(3):87–98.
 47. Kim W-S, Park B-S, Sung J-H. The wound-healing and antioxidant effects of adipose-derived stem cells. *Expert Opin Biol Ther*. 2009 Jul;9(7):879–87.
 48. Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med*. 2013 Nov 15;45:e54.
 49. Huh C-H, Kim S-Y, Cho H-J, Kim D-S, Lee W-H, Kwon S-B, et al. Effects of mesenchymal stem cells in the reconstruction of skin equivalents. *J Dermatol*

Sci. 2007 Jun;46(3):217–20.

50. Moldovan G-L, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*. 2007 May 18;129(4):665–79.
51. Bravo R. Synthesis of the nuclear protein cyclin (PCNA) and its relationship with DNA replication. *Exp Cell Res*. 1986 Apr;163(2):287–93.
52. Koster MI. p63 in skin development and ectodermal dysplasias. *J Invest Dermatol*. 2010 Oct;130(10):2352–8.
53. Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, et al. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Mar 13;98(6):3156–61.
54. Magnaldo T, Fowles D, Darmon M. Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia. *Differ Res Biol Divers*. 1998 Jul;63(3):159–68.
55. Magnaldo T, Bernerd F, Darmon M. Galectin-7, a human 14-kDa S-lectin, specifically expressed in keratinocytes and sensitive to retinoic acid. *Dev Biol*. 1995 Apr;168(2):259–71.
56. Panjwani N. Role of galectins in re-epithelialization of wounds. *Ann Transl Med*. 2014 Sep;2(9):89.
57. Cao Z, Said N, Wu HK, Kuwabara I, Liu F-T, Panjwani N. Galectin-7 as a potential mediator of corneal epithelial cell migration. *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960*. 2003 Jan;121(1):82–6.
58. Gendronneau G, Sidhu SS, Delacour D, Dang T, Calonne C, Houzelstein D, et al. Galectin-7 in the control of epidermal homeostasis after injury. *Mol Biol Cell*. 2008 Dec;19(12):5541–9.
59. Chen H-L, Chiang P-C, Lo C-H, Lo Y-H, Hsu DK, Chen H-Y, et al. Galectin-7 Regulates Keratinocyte Proliferation and Differentiation through JNK-miR-203-p63 Signaling. *J Invest Dermatol*. 2016 Jan;136(1):182–91.
60. Nishiyama T, Kii I, Kashima TG, Kikuchi Y, Ohazama A, Shimazaki M, et al. Delayed re-epithelialization in periostin-deficient mice during cutaneous wound healing. *PloS One*. 2011 Apr 7;6(4):e18410.
61. Liao H-T, Chen C-T. Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014 Jul 26;6(3):288–95.
62. Shafiee A, Seyedjafari E, Soleimani M, Ahmadbeigi N, Dinarvand P, Ghaemi N. A comparison between osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Biotechnol Lett*. 2011 Jun;33(6):1257–64.
63. Koussounadis A, Langdon SP, Um IH, Harrison DJ, Smith VA. Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a

xenograft model system. Sci Rep [Internet]. 2015 Jun 8 [cited 2017 Mar 14];5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4459080/>

64. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet*. 2012 Mar 13;13(4):227–32.
65. Harrison CA, Gray PC, Vale WW, Robertson DM. Antagonists of activin signaling: mechanisms and potential biological applications. *Trends Endocrinol Metab*. 2005 Mar;16(2):73–8.
66. Munz B, Smola H, Engelhardt F, Bleuel K, Brauchle M, Lein I, et al. Overexpression of activin A in the skin of transgenic mice reveals new activities of activin in epidermal morphogenesis, dermal fibrosis and wound repair. *EMBO J*. 1999 Oct 1;18(19):5205–15.
67. Bamberger C, Schärer A, Antsiferova M, Tychsen B, Pankow S, Müller M, et al. Activin controls skin morphogenesis and wound repair predominantly via stromal cells and in a concentration-dependent manner via keratinocytes. *Am J Pathol*. 2005 Sep;167(3):733–47.
68. Nakamura M, Matzuk MM, Gerstmayr B, Bosio A, Lauster R, Miyachi Y, et al. Control of pelage hair follicle development and cycling by complex interactions between follistatin and activin. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2003 Mar;17(3):497–9.
69. Shao LE, Frigon NL, Yu A, Palyash J, Yu J. Contrasting effects of inflammatory cytokines and glucocorticoids on the production of activin A in human marrow stromal cells and their implications. *Cytokine*. 1998 Mar;10(3):227–35.
70. Shao L, Frigon NL, Sehy DW, Yu AL, Lofgren J, Schwall R, et al. Regulation of production of activin A in human marrow stromal cells and monocytes. *Exp Hematol*. 1992 Nov;20(10):1235–42.
71. Ghahary A, Ghaffari A. Role of keratinocyte-fibroblast cross-talk in development of hypertrophic scar. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*. 2007 Oct;15 Suppl 1:S46-53.

Abstract

Effects of adult mesenchymal stem cells in the epidermal regeneration

Jee-Woong Choi, M.D.

(Directed by Kyoung-Chan Park, M.D., Ph.D.)

Department of Dermatology

The Graduate School

Seoul National University College of Medicine

Recently, various stem cells have been widely used in tissue regeneration engineering. Among them, the adult mesenchymal stem cells (AMSCs) are multipotent cells that can be isolated from diverse human tissues and used for the wound healing and anti-aging research with fewer ethical constraints. In this study, the author reconstructed three-dimensional living skin equivalents (LSEs) cultured with two different AMSCs [adipose-derived stem cells (ADSCs) and bone marrow mesenchymal stem cells

(BMSCs)], and fibroblasts, respectively. Then, the author compared with these LSEs to verify the effect of the stem cells in the epidermal regeneration process and the dermal-epidermal interaction, and also aimed to find out about the proteins that play an important role in the epidermal regeneration process involving stem cells.

To investigate the effects of the AMSCs on the epidermal regeneration, *in vitro* LSEs were reconstructed by co-culture of keratinocytes with each of the different cell types (fibroblasts, ADSCs, BMSCs) as dermal matrix cells. Characteristics of the epidermal structures together with keratinocyte growth, differentiation, and basement membrane integrity were analyzed by H&E staining. Additionally, immunohistochemistry was used to study the expression patterns of proteins related with wound healing, epidermal proliferation, differentiation, and basement membrane formation. The author also performed high-throughput mRNA sequencing of three types of dermal matrix cells in order to clarify the causes of differences in characteristics between cultured LSEs. The associated protein expression was evaluated by signal intensity scoring and image analysis using immunofluorescence images.

Compared to fibroblast base LSEs, stem cell based LSEs showed similar appearances to normal skin. It can be assumed that the stem cell based LSE is thicker and more real skin-like due to the increased genes that were grouped as EGF-like domain cluster. Moreover, the basement membrane was clearly identified in the stem cell based LSE. Similar phenomenon was also seen in integrin immunofluorescent staining. These finding can be explained by the paracrine effects that allow stem cells and

their derivatives to secrete various antioxidant mediators.

Consistent with previous reports, the author found that galectin-7 was strongly expressed in stem cell based LSEs which seem to have good ability of keratinocyte differentiation. Activin A was increased in AMSCs in high-throughput mRNA sequencing analysis, and was expressed largely in both epidermal and dermal layers in immunofluorescent staining. The protein produced from the stem cells of the LSE affects the basal keratinocytes through paracrine effects, and contributes to epidermal proliferation and keratinocyte migration. The protein is also produced by keratinocytes, affecting the dermis, and thus it could be considered that activin A is an important mediator in dermal-epidermal interaction.

Key words: adipose-derived stem cells, bone marrow mesenchymal stem cells, epidermal regeneration, skin equivalents, wound healing

Student number : 2015-30575